



Rec'd PCT/PTO 24 JAN 2005

PO/FR 03/02318

REC'D 24 OCT 2003

WIPO PCT

10/522161

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

6 bis, rue de Saint-Pétersbourg
 5800 Paris Cedex 08
 Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle VI


 N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 300301

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 25 JUIL 2002

LIEU 75 INPI PARIS

 N° D'ENREGISTREMENT 0209456
 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE
 PAR L'INPI 25 JUIL. 2002

Vos références pour ce dossier
 (facultatif)

BFF 02/0290

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
 À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
 2, Place d'Estienne d'Orves
 75441 PARIS CEDEX 09

Confirmation d'un dépôt par télécopie

N° attribué par l'INPI à la télécopie

2. NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

 Demande de brevet

 Demande de certificat d'utilité

 Demande divisionnaire

Demande de brevet initiale

ou demande de certificat d'utilité initiale

 Transformation d'une demande de
 brevet européen *Demande de brevet initiale*

 Date

 Date

 Date

N°

3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de fabrication de puces biologiques

**4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ
 OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
 LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
 DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

 Date

N°

Pays ou organisation

 Date

N°

Pays ou organisation

 Date

N°

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

5. DEMANDEUR

S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

Nom ou dénomination sociale

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Rue

3, rue Michel Ange

Adressse

Code postal et ville

75016 PARIS

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

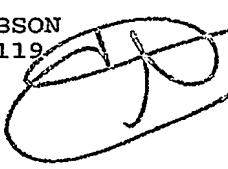
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 2/2

52

Réservé à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES	
DATE	25 JUIL 2002
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0209456
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 17 / 300301

6 MANDATAIRE	
Nom Prénom Cabinet ou Société N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)	
CABINET LAVOIX 2 Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09 01 53 20 14 20 01 48 74 54 56 brevets@cabinet-lavoix.com	
7 INVENTEUR (S)	
Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE	
Établissement immédiat ou établissement différé Paiement échelonné de la redevance	
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES	
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	
C. JACOBSON n° 92.1119 	
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
	

L'invention concerne un procédé d'immobilisation d'ADN, de protéines ou d'oligo ou polysaccharides sur un support solide pour la fabrication de puces biologiques, et les puces obtenues par ce procédé.

5 Différents procédés sont aujourd'hui utilisés pour la fabrication de puces à ADN. Selon une première méthode, des oligonucléotides sont synthétisés directement sur le support après ancrage covalent d'un précurseur (système Affymetrix, Niemeyer et Blohm Angew ; Chem. Int. Ed. 1999, 38, 2865-2869), ce qui conduit à des puces de coût élevé. Le 10 fournisseur ne fournit en outre pas tous les détails sur les séquences des oligonucléotides immobilisés.

Selon une deuxième approche, les oligonucléotides sont
15 présynthétisés, biotinylés et déposés ensuite sur une plaque activée
par une couche de streptavidine. L'accrochage se fait via des
interactions spécifiques non covalentes biotine-streptavidine, cette
dernière étant une protéine ayant l'inconvénient d'être de stabilité
modérée. Lorsque les puces sont constituées de fragments d'ADNc,
ceux-ci sont le plus souvent immobilisés par adsorption sur une couche
d'aminosilane ou de polylysine. Cette dernière stratégie pose souvent
20 des problèmes de répétabilité et d'homogénéité de surface liés à la
difficulté de contrôler la qualité du film de polylysine et sa stabilité.

Selon une troisième voie, les oligonucléotides ou ADNc sont ancrés sur le support grâce à un couplage covalent, via un lien chimique organique. Cela nécessite (a) la fonctionnalisation de la surface par des chaînes à terminaisons réactives, par exemple des fonctions acide carboxylique activées, (b) la modification des oligonucléotides ou ADNc en position 5' par une fonction, par exemple une amine primaire, susceptible de réagir avec les terminaisons mentionnées ci-dessus. Il s'agit de produits "clés en main" d'un coût relativement élevé, imposant l'achat des oligonucléotides convenablement modifiés. Ces approches sont décrites notamment dans la demande de brevet WO 01/42 495.

La technologie des puces à ADN est également discutée dans l'article de revue de Wang, Nucleic Acids Res., 2000, 28(16):3011-3016.

Parallèlement, ont été développées des puces sur lesquelles 5 des polymères biologiques autres que de l'ADN étaient immobilisés, par exemple des protéines ou peptides.

Cette technologie a été mise au point principalement par adaptation de la technologie des puces à ADN (cf par exemple la demande WO 93/22 680 d'Affymax).

10 Une approche de fixation de protéines par liaison covalente est par exemple rapportée dans Mac Beath et Schreiber, Science, 2000, 289:1760-1763, Mitchell, Nature Biotechnology, 2002, 20, 225-229 et « Protein microarray technology », dans Trends in Biotechnology, 2002, 20(4), 160-166.

15

Les auteurs de la présente invention ont maintenant mis au point un nouveau procédé de fabrication de produits de type puces biologiques, qui présente en outre des avantages vis-à-vis des techniques existantes.

20 Il s'agit d'immobiliser des polymères biologiques, tels qu'ADN, protéines, oligo ou polysaccharides, porteurs d'un groupement phosphate $(OP(O)(OH)_2)$ ou phosphonate $(P(O)(OH)_2)$ libre, sur un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec lesdits groupements phosphate ou 25 phosphonate. Ces groupements qui servent de fonctions d'ancre peuvent être présents naturellement dans le polymère ou introduits par modification enzymatique ou chimique.

L'ancre s'effectue alors par liaison iono-covalente entre le groupement phosphate libre du polymère et le métal.

30 Ce mode d'ancre, du type iono-covalent, est plus résistant que les systèmes mettant en jeu des interactions du type liaison

hydrogène ou du type électrostatique (comme c'est le cas avec la polylysine par exemple).

La présente invention a donc pour objet une méthode de fabrication d'un produit de type puce biologique comprenant 5 l'immobilisation d'au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre sur un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, ledit polymère biologique étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente entre le groupement phosphate ou phosphonate libre dudit polymère et le métal.

10 Un autre objet de l'invention est un produit obtenu par ce procédé, à savoir un produit de type puce biologique, comprenant un support solide plan présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente.

15 Un kit de préparation d'un produit tel que défini précédemment fait également partie de l'invention. Ce kit comprend les éléments suivants :

- un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate ;
- au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre ;
- éventuellement des réactifs. Une solution d'acide phosphonique peut par exemple être utile dans l'hypothèse où on désirerait saturer les sites de coordination sur les zones non ciblées. Une solution d'acide phosphonique 1 mM (exemple : $C_4H_9PO_3H_2$) peut notamment être utilisée.

L'invention vise par ailleurs l'utilisation d'un produit de type puce biologique tel que défini ci-dessus, à des fins de criblage de composés susceptibles de se lier audit polymère biologique immobilisé, ou comme outil de diagnostic *in vitro*.

5

Préparation du polymère biologique

Par "polymère biologique", on entend un composé à base d'unités monomériques reliées entre elles, qui présente une activité biologique ou réagit avec un composé ayant une activité biologique.

On peut citer notamment les acides nucléiques, tels que ARN ou ADN, en particulier de l'ADNc ou des oligonucléotides ; des peptides, protéines, oligo ou polysaccharides. Des monomères synthétiques, qui n'existent pas de manière naturelle, peuvent éventuellement être utilisés pour construire un polymère biologique. Dans cette optique, peuvent par exemple être utilisés des carbamates, phosphonates, sulfonamides, et sulfoxides.

Comme autres exemples de polymère biologique, on peut également citer les PNA ("peptide nucleic acid") et les aptamers.

De manière générale, on peut immobiliser des oligonucléotides, oligoribonucléotides ou peptides que l'on peut former par des techniques combinatoires et qui sont doués de propriétés de reconnaissance vis-à-vis de molécules d'intérêt à détecter.

De manière avantageuse, on peut préparer ou obtenir des polymères biologiques qui présentent un groupement espaceur entre le groupement phosphate et le corps du polymère. Dans le cas où le polymère est un acide nucléique, on peut utiliser notamment des espaceurs du type polyA, polyC, polyT ou polyG (par exemple d'environ 10 mer), dont l'introduction via un synthétiseur est peu onéreuse.

De manière préférentielle, le polymère biologique est un acide nucléique, par exemple de l'ADN phosphorylé en position 5'.

Cette phosphorylation peut être réalisée facilement au moyen d'enzymes de type kinases, par exemple la T4 polynucléotide kinase en présence d'ATP, classiquement utilisée dans les réactions de PCR.

Le polymère biologique peut également être un acide nucléique, par exemple de l'ADN, phosphorylé en position 3'. Cette phosphorylation peut être réalisée chimiquement par des techniques standards, relatives à la chimie des phosphoramidites.

Le polymère biologique peut également être fonctionnalisé par une chaîne à terminaison acide phosphonique (par exemple un groupement $-(CH_2)_6-PO_3H_2$), au moyen d'un couplage chimique. Dans ce cas, on peut utiliser par exemple un acide halogénoalkylphosphonique pour les oligonucléotides ou les saccharides ou un acide aminoalkylphosphonique pour les peptides.

Les acides nucléiques utilisés sont de préférence constitués de 25 à 70 mer (c'est-à-dire paires de bases), de préférence 40 – 50 mer, pour les oligonucléotides et de 100 à 2000 paires de bases pour les ADNc.

Selon un autre mode de réalisation, le polymère biologique est une protéine, un oligo ou polysaccharide ou un peptide fonctionnalisé ou modifié par un groupement phosphate ou phosphonate. Cette modification peut être réalisée par des méthodes chimiques ou enzymatiques, sauf bien sûr dans le cas où des groupements phosphate ou phosphonate libres sont présents naturellement, comme c'est le cas pour des peptides, protéines, voire même des oligo- ou polysaccharides déjà phosphorylés.

Préparation du support

Le support solide plan choisi peut être de n'importe quelle matière appropriée pour la fabrication de produits de type puces selon l'invention. On peut utiliser notamment un support en verre, en silicium, en mica, en quartz, en plastique, ou à base de divers polymères synthétiques. Le support peut être en outre recouvert d'une fine couche

d'or. Les supports en verre sont préférés, et on peut utiliser par exemple une lame de microscope, plus généralement toute plaque ou lame de verre, de quartz ou de silicium. La forme du support n'a pas d'importance.

5 Conformément à l'invention, le support présente une surface recouverte d'un métal. Ce métal est choisi de manière à être capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate. Le zirconium est particulièrement adapté, mais on peut citer également, à titre d'exemples, d'autres métaux tétravalents comme
 10 le titane, le vanadium, l'étain ; des métaux trivalents comme l'aluminium, le fer, le chrome, le gallium ; toute une série de métaux divalents comme le zinc, le manganèse, le cuivre, le cobalt, le nickel ; quelques cas de métaux hexavalents comme le molybdène, l'uranium, le tungstène. Une revue récente sur les métallophosphonates récapitule
 15 ces possibilités (A. Clearfield in *Progress in Inorganic Chemistry*, Vol. 47, (Ed.: K. D. Karlin), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998, pp. 371-510).

De préférence, ce métal est déposé sur la surface du support sous la forme d'une monocouche.

20 Il peut notamment être lié à la surface du support par l'intermédiaire d'une molécule ou bras espaceur. Il peut s'agir par exemple d'une chaîne d'acide gras portant un groupement phosphonate (par exemple, l'acide octadécylphosphonique), auquel se lie le métal par liaison iono-covalente.

25 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la molécule espaceur est l'acide octadécylphosphonique et le métal est le zirconium.

30 De manière avantageuse, on utilise des lames de verre sur lesquelles repose un film de type Langmuir-Blodgett à base de phosphonate de zirconium, préparées par le procédé tel que décrit dans Benitez et al., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124:4363-4370, par

immersion dans différentes solutions aqueuses. Dans ce cas, le film est lié au support de verre via des interactions hydrophobe-hydrophobe.

Ce procédé met en œuvre de l'acide octadécyldiphosphonique qui est une molécule amphiphile qui, une fois déposée à la surface 5 d'une phase aqueuse, oriente sa tête polaire PO_3H_2 , côté eau et sa chaîne carbonée côté air. En comprimant ces molécules, on peut alors former une monocouche de Langmuir-Blodgett qui peut être transférée sur une lame de verre ayant subi un traitement pour la rendre hydrophobe (par exemple, un traitement avec l'octadécyldichlorosilane). 10 A ce stade, la lame est devenue hydrophile puisque ce sont les groupes acide phosphonique qui sont présents à la surface. Ceux-ci ont une forte affinité pour les ions métalliques tels que le zirconium pour former des liaisons iono-covalentes métal- PO_3 .

On obtient ainsi une surface à caractère métallique, 15 constituée d'atomes de zirconium arrangés de manière régulière, la couche Langmuir-Blodgett mesurant alors 2,4 nm d'épaisseur.

Les supports mis en œuvre conformément à l'invention ont l'avantage d'être stables au cours du temps, et ne nécessitent pas de pré-activation nécessaire. Ils peuvent par ailleurs être stockés 20 simplement dans l'eau.

Le film de phosphonate de zirconium peut également être fixé de façon covalente au support, en procédant comme décrit dans Katz et al., Chem. Mater., 1991, 3:699-703. Une première possibilité est de fonctionnaliser la surface de verre par le 3-aminopropyltriméthoxysilane 25 qui vient se greffer sur la surface, et les fonctions NH_2 terminales sont ensuite traitées par POCl_3 et une base, pour introduire en bout de chaîne les groupes PO_3H_2 qui sont prêts à recevoir la couche de zirconium. Une autre possibilité est de prendre des lames de mica ou de silicium recouvertes d'une couche d'or, et de les traiter avec l'acide 30 8-mercaptopoctylphosphonique ($\text{HS-(CH}_2\text{)}_8\text{-PO}_3\text{H}_2$) qui se greffe via un couplage thiol / or.

Des lames de borosilicate revêtues d'une fine couche d'or peuvent également être fonctionnalisées par des terminaisons PO_3H_2 selon Brochsztai et al, J. Mater. Chem., 2002, 12:1250-1255, par traitement successivement avec du 2-mercaptopropanoïde (HS-C₂H₅-OH) et une solution (POCl₃ + collidine).

Immobilisation des polymères biologiques

Les polymères biologiques peuvent être déposés sur le support par simple "spotting". De manière usuelle, il s'agit d'une opération de dépôt de microgouttes (par exemple environ 50 picolitres) ou « spots », au moyen d'un robot effectuant des prélèvements dans les puits de plaques de microtitration, par exemple.

Les polymères se fixent par liaison de coordination, de type iono-covalente, avec le métal à la surface du support.

Les spots sont de préférence arrangés sous la forme d'un réseau (ou "array") organisé. Tel qu'utilisé ici, le terme réseau ou "array" est un arrangement ordonné de spots de polymères biologiques, comme dans une matrice de lignes ou de colonnes. Typiquement, pour des spots d'environ 150 microns de diamètre et espacés de 300 microns, la densité de spots est de l'ordre de 500 par cm². De préférence, le réseau contient plus d'un polymère biologique immobilisé.

Dans le contexte de la présente invention, le terme "produit ou dispositif de type puce biologique" doit être compris comme incluant tout support solide sur lequel au moins un polymère biologique est immobilisé.

Du fait de l'orientation des polymères biologiques substantiellement perpendiculaire au support, on peut éventuellement immobiliser ces polymères à une haute densité, notamment jusqu'à une densité de 10¹⁰-10¹² polymères par cm².

Un objet particulier de l'invention est un produit de type puce biologique, comprenant une lame de verre présentant une surface recouverte d'une monocouche d'octadécyphosphonate de zirconium, au moins un acide nucléique portant un groupement phosphate en 5' 5 étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente entre ledit groupement phosphate de l'acide nucléique et le zirconium.

Utilisation des produits fabriqués

Les produits de type puce biologique fabriqués conformément 10 à l'invention trouvent de multiples applications, par exemple pour des analyses biologiques et du criblage de composés susceptibles de se lier aux polymères immobilisés.

De manière générale, l'analyse des puces et "arrays" peut être réalisée selon diverses techniques bien connues de l'homme du 15 métier (par exemple fluorescence, radioactivité, spectrométrie de masse, résonance plasmonique de surface, infra-rouge, chimiluminescence).

Lorsque le polymère biologique est un acide nucléique, les 20 produits de l'invention constituent des outils performants pour l'analyse en parallèle d'un grand nombre de gènes ou de séquences d'ADN ou d'ARN. Leur principe de fonctionnement repose sur la propriété d'hybridation ou d'appariement de deux brins de séquences complémentaires afin de reconstituer la double hélice d'ADN. Selon un mode de réalisation particulier, des sondes d'oligonucléotides de 25 séquence connue, immobilisées sur un substrat support, sont mises en présence de cibles extraites d'un échantillon biologique à analyser, et marquées à l'aide de marqueurs fluorescents.

Selon un mode de réalisation particulier, pour savoir où il y a eu hybridation, la puce est ensuite lue sur un microscope confocal, puis 30 analysée en quantifiant l'intensité de fluorescence sur les différents spots, chacun d'eux correspondant à une séquence donnée.

Les produits de l'invention sont particulièrement adaptés pour étudier des profils d'expression d'ARNm, séquences des acides nucléiques, ou rechercher des polymorphismes ou des mutations dans de l'ADN génomique, par exemple.

5 De manière générale, les produits de l'invention constituent des outils diagnostiques simples et pratiques d'utilisation, pour la détection de maladies infectieuses ou génétiques notamment.

10 Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDE DES FIGURES :

15 La figure 1 représente un schéma de principe de formation de films Langmuir-Blodgett (LB) à partir d'acides phosphoniques à chaîne longue. Le dépôt du film LB a lieu sur les deux faces de la lame de verre.

La figure 2 représente un schéma d'ancrage d'un oligonucléotide sur une plaque portant une couche de phosphonate de zirconium, et l'utilisation du produit obtenu par un test d'hybridation.

20

EXEMPLES

Exemple 1 : Immobilisation d'oligonucléotides

25

1.1 Obtention du support

On utilise des lames de verre revêtues d'un film LB à base de phosphonate de zirconium, comme illustré à la figure 1 et comme décrit dans Benítez et al., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124:4363-4370.

30

Les lames de verre sont ensuite stockées dans de l'eau ultrapure (résistivité voisine de 18 MΩ/cm). Avant utilisation, celles-ci

sont séchées par centrifugation avant d'être spottées à l'aide d'un robot. Les deux côtés de la lame peuvent être utilisés indifféremment.

1.2 Essai préliminaire :

Une première étude de faisabilité a montré qu'un oligonucléotide de 35 bases, phosphorylé en position 3' et marqué en position 5' par une sonde fluorescente CY3, s'ancre spontanément par simple "spotting" sur les films de Langmuir-Blodgett à base de phosphonate de zirconium. Il apparaît que c'est bien le phosphate terminal qui est responsable de l'ancrage sur le film, car pour un oligonucléotide identique non phosphorylé en 3', dans les mêmes conditions de "spotting", la quantité de sondes fixée est très inférieure (d'un facteur 5). Cette fixation "non spécifique" est probablement provoquée par une interaction du zirconium avec les groupements phosphodiester joignant les unités nucléotidiques. De plus, la fixation est stable dans les conditions standard de lavage des puces à ADN. On constate donc un bon accrochage de l'oligonucléotide phosphorylé par rapport à l'homologue non phosphorylé.

20 1.3 Oligonucléotides employés :

Dans cet essai, on a immobilisé quatre types d'oligonucléotides, à savoir :

- un oligonucléotide 35 mer (baptisé 1) ;
- son analogue phosphorylé en position 5' (baptisé 2 = 1-5'-OPO₃H₂) ;
- l'analogue de 2 comportant un groupe espaceur de 11 motifs adénine, entre l'oligonucléotide et le groupement phosphate terminal (baptisé 3 = 1-(A)₁₁-5'-OPO₃H₂) ; et
- l'analogue de 3 non phosphorylé (baptisé 4 = 1-(A)₁₁)

30

1.4 Immobilisation des oligonucléotides :

Les oligonucléotides en solution dans du SSC 1X (pH ajusté à 6 par ajout d'HCl) ont été "spottés" sur ces lames, à des concentrations de 50 µM, 20 µM et 5 µM.

Après "spotting", on laisse sécher les lames à l'air libre et on les laisse pendant 24 heures dans une boîte fermée. Les lames sont ensuite rincées pendant 2 minutes dans 4 bains successifs : SSC 2X + 0,1 % SDS, SSC 1X, puis deux fois SSC 0,2X. Après séchage par centrifugation, les lames sont prêtes pour hybridation.

10

Exemple 2 : Test d'hybridation utilisant la puce à ADN

Des tests d'hybridation ont été effectués avec la lame de verre préparée conformément à l'exemple 1, sur laquelle les quatre types d'oligonucléotides sont immobilisés.

15 Pour cela, on a déposé sous lamelle 20 µl d'une solution de l'oligonucléotide 35 mer complémentaire, marqué en position 5' par un motif CY3. La concentration en oligonucléotide complémentaire choisie a une valeur correspondant à 0,002 unité DO/µl (soit dans ce cas environ 5 µM), le solvant utilisé étant un mélange d'hybridation 20 classique contenant du formamide, du tampon Tris EDTA pH8 [tris = tris(hydroxyméthyl)aminométhane], du SDS 10% [SDS = dodécylsulfonate de sodium] et du tampon SSC 20 X [NaCl 3M et citrate de sodium 0,3M]. L'hybridation est réalisée à 42°C pendant une nuit dans des chambres d'hybridation du type « Arrayit ». A l'issue de 25 l'hybridation, les lames ont subi un lavage pendant 2 minutes dans 4 bains successifs : SSC 2X + 0,1 % SDS, SSC 1X, puis deux fois SSC 0,2X. Après séchage par centrifugation, la saisie des images rendant compte de la fluorescence des différents spots (tâches) a été analysée sur un scanner. L'analyse de ces images a permis de quantifier 30 l'intensité de fluorescence des différents spots. La même procédure a été effectuée en utilisant pour l'hybridation un oligonucléotide 35 mer

non complémentaire, marqué également en position 5' par un motif CY3.

Lorsque l'oligonucléotide non complémentaire est utilisé, aucune fluorescence n'est détectée. Lorsque l'oligonucléotide complémentaire 5 est utilisé, un signal de fluorescence est observé sur tous les spots, avec les caractéristiques suivantes :

- 1- Bruit de fond autour des spots faible (fond noir).
- 2- L'intensité de fluorescence des spots correspondant à 1 et 4 est 6 fois plus faible que pour leur homologue phosphorylé en 5', 10 pour une même concentration de dépôt. Cela montre l'effet favorable très net de la présence du groupe phosphate pour l'accrochage de l'oligonucléotide sur le support.
- 3- L'intensité de fluorescence des spots correspondant à 3 est 1,6 fois plus forte [puissance laser 80%, puissance 15 photomultiplicateur 70% : intensité 48000] que pour l'oligonucléotide 2, pour une même concentration de dépôt. Cela montre l'effet favorable très net de la présence d'un groupe espaceur (11 motifs adénine) entre l'oligonucléotide et le groupe phosphate, permettant d'éloigner l'oligonucléotide de la surface du support, et facilitant ainsi l'hybridation.
- 20 4- Pour les oligonucléotides 2 et 3, les intensités de fluorescence pour des concentrations de dépôt respectivement de 50, 20 et 5 μ M est de 2/2/1, ce qui montre que la concentration de dépôt optimale se situe entre 20 et 5 μ M.

REVENDICATIONS

- 5 1. Produit de type puce biologique, comprenant un support solide plan présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre étant immobilisé sur
10 ladite surface par liaison iono-covalente entre le groupement phosphate ou phosphonate libre dudit polymère et le métal.
- 15 2. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est un acide nucléique phosphorylé en position 5'.
3. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est un acide nucléique phosphorylé en position 3'.
- 20 4. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est une protéine phosphorylée.
- 25 5. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est un oligo ou polysaccharide phosphorylé ou modifié par un groupement phosphonate.
6. Produit selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel le métal est lié à la surface du support par l'intermédiaire d'une molécule espaceur.
- 30 7. Produit selon la revendication 6, dans lequel la molécule espaceur comprend une chaîne d'acide gras portant un

groupement phosphonate, auquel se lie le métal par liaison iono-covalente.

8. Produit selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le métal
5 est le zirconium.

9. Produit selon la revendication 7, dans lequel la molécule
espaceur est l'acide octadécyphosphonique et le métal est le
zirconium.

10 10. Produit selon l'une des revendications précédentes, dans lequel
le support est du verre.

11. Produit selon la revendication 1, comprenant une lame de verre
15 présentant une surface recouverte d'une monocouche
d'octadécyphosphonate de zirconium, au moins un acide
nucléique portant un groupement phosphate en 5' étant
immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente entre
ledit groupement phosphate de l'acide nucléique et le zirconium.

20 12. Méthode de fabrication d'un produit de type puce biologique, tel
que défini dans l'une des revendications 1 à 11, comprenant
l'immobilisation d'au moins un polymère biologique portant un
groupement phosphate ou phosphonate libre sur un support
solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de
liaison de coordination avec un groupement phosphate ou
phosphonate, ledit polymère biologique étant immobilisé sur
ladite surface par liaison iono-covalente entre le groupement
phosphate ou phosphonate libre dudit polymère et le métal.

25 30

13. Méthode selon la revendication 12, comprenant en outre une étape d'obtention du polymère biologique portant un groupement phosphate.

5 14. Méthode selon la revendication 13, dans laquelle le polymère est un acide nucléique phosphorylé en 5' par voie enzymatique.

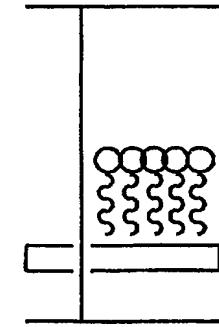
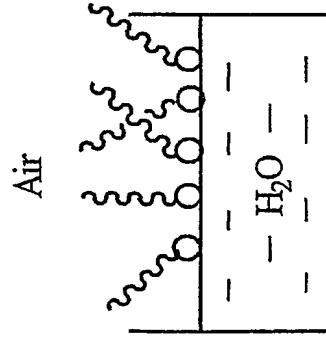
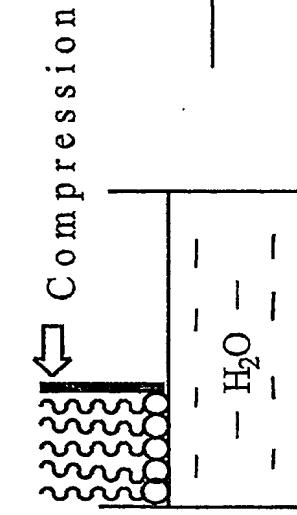
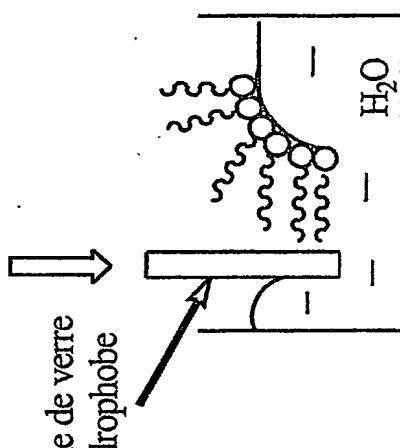
10 15. Kit de préparation d'un produit de type puce biologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, comprenant les éléments suivants :

- un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate ;
- au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate ;
- éventuellement des réactifs.

15 16. Utilisation d'un produit de type puce biologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, à des fins de criblage de composés susceptibles de se lier audit polymère biologique immobilisé.

20 25 17. Utilisation d'un produit de type puce biologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, comme outil de diagnostic *in vitro*.

1/2



solution d'ions
 Zr^{4+}

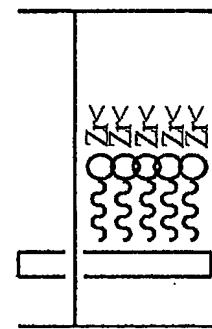


FIG.1

2/2

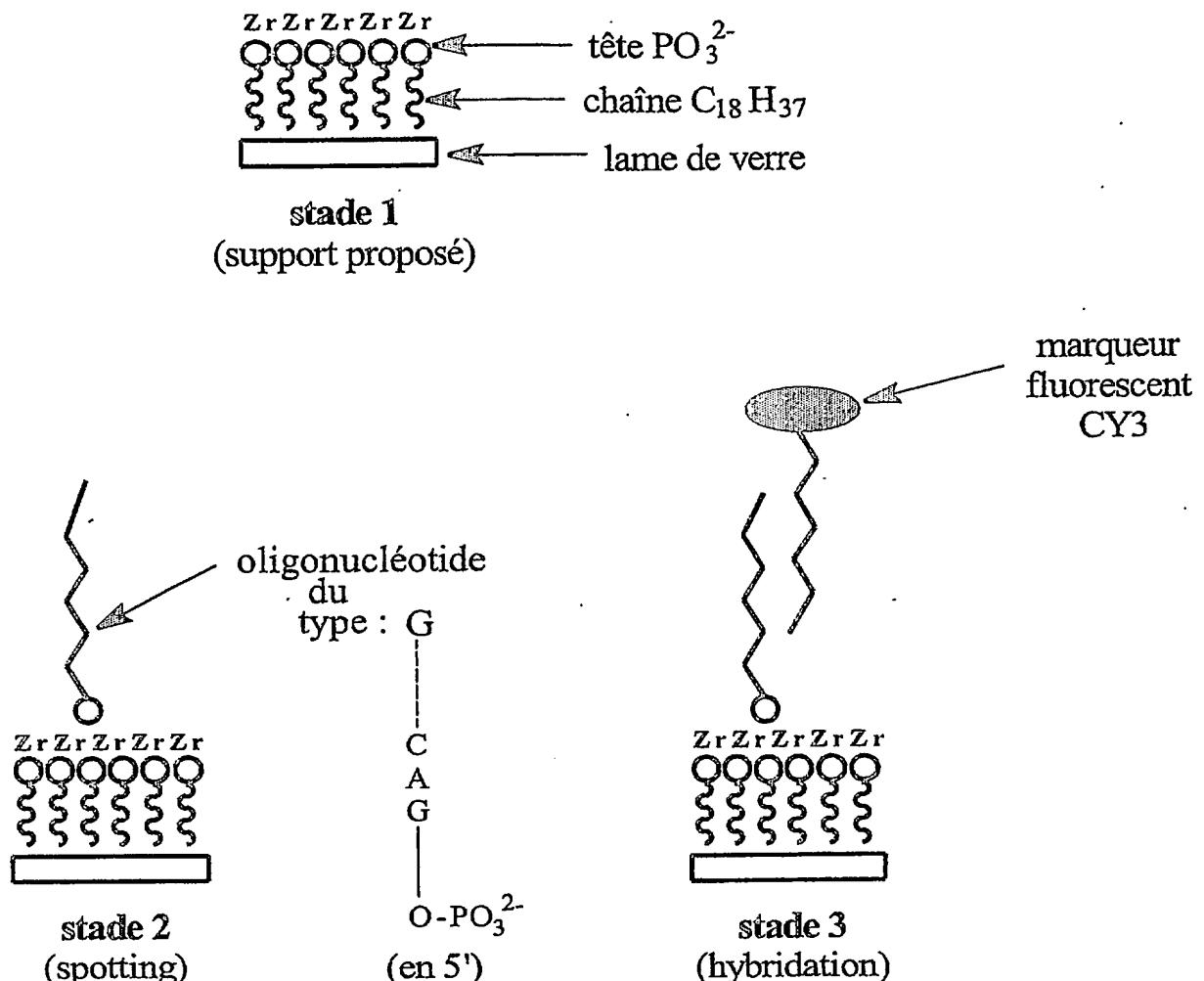


FIG.2

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

INV

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BFF 02/0290
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 09456
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
Procédé de fabrication de puces biologiques	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom	TELLIER		
Prénoms	Charles		
Adresse	Rue	3, rue du plongeon	
	Code postal et ville	44130 NOTRE DAME DES LANDES FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
2 Nom	PIPELIER		
Prénoms	Muriel		
Adresse	Rue	4, rue Marconi	
	Code postal et ville	44000 NANTES FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
3 Nom	DUBREUIL		
Prénoms	Didier		
Adresse	Rue	7, La Boulaye	
	Code postal et ville	44710 PORT SAINT PERE FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

Paris, le 26 septembre 2002

C. JACOBSON
n° 92.1119

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 2706

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BFF 02/0290
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 09456

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de fabrication de puces biologiques

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom	BUJOLI		
Prénoms	Bruno		
Adresse	Rue	La Basse Bodinière	
	Code postal et ville	44240 SUCE SUR ERDRE	FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)			
2 Nom	TALHAM		
Prénoms	Daniel		
Adresse	Rue	1040 NE 5th Terr.	
	Code postal et ville	Gainesville, FL 32601	U.S.A.
Société d'appartenance (facultatif)			
3 Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

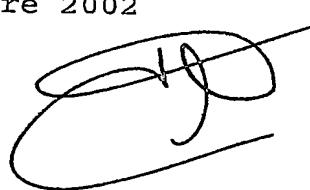
DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 26 septembre 2002

C. JACOBSON
n° 92.1119



PCT Application
FR0302318



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.